

На правах рукописи

ПЕТРОВА ОЛЬГА ЕВГЕНЬЕВНА

**ТРАНСФОРМАЦИЯ НИТРОЭФИРА ЦЕЛЛЮЛОЗЫ
СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩЕЙ БАКТЕРИЕЙ
*DESULFOVIBRIO DESULFURICANS 1388***

03.00.07 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

КАЗАНЬ – 2004

Работа выполнена в лаборатории молекулярных основ патогенеза института биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН

Научный руководитель

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
Давыдова М. Н.

Официальные оппоненты

доктор биологических наук,
профессор Наумова Р. П.

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
Гарейшина А. З.

Ведущая организация

Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов РАН

Защита состоится “__” _____ 2004 г. в ____ на заседании диссертационного_совета Д.212.081.08 при Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования “Казанский государственный университет им. В. И. Ульянова - Ленина”, 420008, г. Казань, ул. Кремлёвская, д. 18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского государственного университета

Автореферат разослан _____ сентября 2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного Совета
кандидат биологических наук

Аскарова А. Н.

Актуальность проблемы. Характерной особенностью современного развития биосферы является высокая интенсивность и широкий спектр антропогенных загрязнений, поступающих в природные экосистемы.

Накопление в окружающей среде неприродных материалов даже с минимальной токсичностью не может быть безопасным для биоты (Alexander, 1994), так как влечет за собой смещение биологического равновесия в сторону доминирующего развития видов-утилизаторов, и, как следствие, прямые или опосредованные изменения трофических связей: микроорганизмы – животные – человек. В результате разложения ксенобиотика могут образовываться природные продукты, не характерные для данной экосистемы и вызывающие вторичное угнетение микрофлоры. Всё это может явиться причиной экологического стресса, последствия которого должны быть просчитаны заранее с использованием как новых, так и традиционных методов и модельных систем.

Искусственные полимеры на основе нитратов целлюлозы находят широкое применение в производстве порохов, фильтрующих материалов, лаков, красок, искусственных кож, целлулоида. Отходы производства нитроцеллюлозы, являясь нетоксичным материалом (Wang et al., 1982,a), в больших объемах приравняются к веществам с выраженным мутагенным действием (Ильинская, 1987). Ди- и тринитраты целлюлозы с содержанием азота свыше 10 % являются взрывоопасными. Применяемые в настоящее время методы обработки отходов производства нитроцеллюлозы имеют ряд существенных недостатков. Физико-химические методы: мембранная фильтрация с применением коагулирующих агентов, химический гидролиз, сжигание (Wendt, Kaplan, 1976, Wang et al., 1982,б) – дороги и экологически небезопасны. Компостирование и захоронение отходов (White et al., 1993), в силу непредсказуемости биохимических процессов, вызываемых случайной микрофлорой, не дают точного прогноза результатов ее ферментативной активности в отношении как самой нитроцеллюлозы, так и продуктов ее разложения.

Сведения, имеющиеся на сегодняшний день в литературе по вопросу деструкции нитроцеллюлозы микроорганизмами, касаются в основном аэробных процессов трансформации ксенобиотика (Brodman, Devine, 1981;

Черкасова, Лихогрудова, 1985; Ильинская, Лещинская, 1988; White et al., 1993) или анаэробной трансформации нитроэфиров целлюлозы накопительными культурами, полученными из производственных очистных сооружений (Freedman et al., 1996; 2002). Практически не изучены физиолого-биохимические основы протекания процесса трансформации синтетического полимера чистыми культурами анаэробных микроорганизмов.

В связи с вышесказанным становится очевидной необходимость изучения взаимного воздействия нитроэфиров целлюлозы и микроорганизмов для научного прогнозирования поведения этого соединения в различных экологических условиях. Поскольку стоки производства НЦ содержат значительные количества сульфатов, сульфатредуцирующие бактерии являются перспективной моделью для изучения анаэробной трансформации НЦ.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы явилось изучение процесса трансформации нитроэфира целлюлозы сульфатредуцирующей бактерией *Desulfovibrio desulfuricans* 1388.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Провести скрининг среди сульфатредуцирующих бактерий рода *Desulfovibrio* на способность к трансформации нитроцеллюлозы.
2. Исследовать физиолого-биохимические и термодинамические параметры роста бактерии *Desulfovibrio desulfuricans* 1388 в присутствии нитроцеллюлозы.
3. Определить характер изменений в молекуле нитроцеллюлозы под влиянием сульфатредуцирующей бактерии *Desulfovibrio desulfuricans* 1388.
4. Исследовать возможность использования сульфатредуцирующих бактерий при биологической очистке заводских стоков, содержащих нитроцеллюлозу.

Научная новизна. Впервые на чистых культурах сульфатредуцирующих бактерий р. *Desulfovibrio* показано, что исследованные микроорганизмы способны вести трансформацию нитроцеллюлозы с высокой степенью нитрованности. Обнаружено, что расщепление нитроэфирных связей в молекуле нитроцеллюлозы происходит под действием неспецифической эстеразы. Установлена корреляция между нитроэстеразной активностью и

активностью щелочной фосфатазы *Desulfovibrio desulfuricans* 1388. Образовавшиеся в результате денитрации нитроцеллюлозы нитраты восстанавливаются до аммония по диссимиляторному пути.

Установлено, что изменения физиологических и термодинамических параметров роста *Desulfovibrio desulfuricans* 1388 в присутствии нитроцеллюлозы определяются, прежде всего, свободными нитратами.

Методами ^{13}C ЯМР- и FTIR-спектроскопии показано, что в результате контакта нитроцеллюлозы с *Desulfovibrio desulfuricans* 1388 в молекуле полимера происходит замена нитрогрупп на гидроксильные группы, приводящая к трансформации нитроцеллюлозы в целлюлозу, доступную для расщепления целлюлолитическими микроорганизмами. Данные ^{13}C ЯМР свидетельствуют, что биологический процесс денитрации полимера бактерией *Desulfovibrio desulfuricans* 1388 затрагивает нитрогруппы, вне зависимости от их положения в глюкопиранозном остатке.

Установлено, что в результате микробной трансформации нитроцеллюлозы бактерией *D. desulfuricans* 1388 происходит расщепление углеродной цепи полимера с образованием нитроолигосахаридов.

Впервые обнаружена способность сульфатредуцирующей бактерии *Desulfovibrio desulfuricans* 1388 использовать целлобиозу как донор электронов.

Полученные результаты расширяют представления о физиологии сульфатредуцирующих бактерий, их способности в условиях дефицита питательных веществ использовать нетрадиционные субстраты для поддержания своей жизнедеятельности.

Практическая значимость. Приведенные данные позволяют рассматривать бактерии р. *Desulfovibrio* в качестве первичного звена в микробном консорциуме при утилизации неприродного полимера – нитроцеллюлозы: бактерии могут инициировать процесс разложения нитроэфиров целлюлозы в условиях заводских стоков, снижая степень нитрованности полимера и делая его доступным для других членов сообщества.

Биологическая очистка отходов производства нитроцеллюлозы, в основу которой положена трансформация полимера сульфатредуцирующими бактериями рода *Desulfovibrio*, может явиться альтернативой физико-

химической обработке. Это позволит сделать отходы безопасными и не исключать их из общего круговорота веществ в природе.

Апробация работы. Основные положения работы были представлены: на IV республиканской научной конференции “Актуальные экологические проблемы республики Татарстан” (Казань, 2000), семинаре-презентации инновационных научно-технических проектов “Биотехнологии - 2001” (Пущино, 2001), III съезде биохимического общества (Санкт-Петербург, 2002), международной конференции “Биокатализ – 2002. Фундаментальные основы и применение” (Москва, 2002), I FEMS конгрессе микробиологов Европы (Ljubljana, 2003), VI и VII международных конгрессах “Congress of the Anaerobe Society of the Americas”(Park City, 2002, Annapolis, 2004), международной конференции “Наука и Бизнес” (Пущино, 2004), III съезде биофизиков России (Воронеж, 2004), научной конференции “Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии” (Казань, 2004), XI Всероссийской конференции “Структура и динамика молекулярных систем” (Яльчик, 2004).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи и 11 тезисов.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 114 страницах машинописного текста; состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, раздела собственных исследований, обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа содержит 13 таблиц, 20 рисунков. Список литературы содержит 171 наименование литературных источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Материалы и объекты исследования и условия культивирования.

Объектами исследования служили сульфатредуцирующие бактерии рода *Desulfovibrio* – *D. desulfuricans* штамм 1388, полученный из Всероссийской коллекции микроорганизмов (Пущино, Россия), а также *D. desulfuricans* штамм 1799, *D. gigas* штамм 1382, *D. vulgaris* штамм 1760, полученные из коллекции Казанского Института биохимии и биофизики КазНЦ

РАН (Казань, Россия). Бактерии выращивали на среде Постгейта Б (Postgate, 1966) в анаэробных условиях.

В экспериментах использовали промышленные образцы НЦ в виде ваты с содержанием азота 11,8 % и образцы отходов производства НЦ с содержанием азота 6,7 – 7,8 % из промышленных отстойников.

Определение ферментативных активностей. Клеточные экстракты получали разрушением бактериальных клеток с помощью ультразвукового диспергатора УЗДН-2Т при частоте 22 кГц в течение 5 минут и последующим центрифугированием при 17000g 1 час. Содержание белка определяли по модифицированному методу Лоури (Горина, Яковлева, 1980). Фракции клеток получали по методу (Badziong, Thauer, 1980). Определение нитроэстеразной активности и активности щелочной и кислой фосфатаз проводили по модифицированным методикам (Ильинская, 1987). Определение нитратредуктазной и нитритредуктазной активности проводили по методике (Arendsen et al., 1999).

Аналитические методы. Количество НЦ определяли весовым методом. Осадок из культуральной жидкости отделяли центрифугированием, отмывали, высушивали, обрабатывали ацетоном в соотношении 1 : 5, отделяли центрифугированием, высушивали до постоянного веса и взвешивали. Содержание нитрат- и нитрит-ионов, а также ионов аммония определяли по (Лурье, 1973, 1984). Количество сероводорода определяли по (Truper, Schlegel, 1964). Количество лактата определяли модифицированным энзиматическим методом (Практикум по биохимии, 1989). Ионы сульфата определяли по методике, утвержденной Госкомитетом по охране окружающей среды (2000). Ацетат определяли методом ГЖХ на приборе “Chrom 5” на кварцевой колонке.

Спектральные методы. Регистрацию ЯМР ^{13}C (75,43 МГц) спектров образцов нитроцеллюлозы в растворителе $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ проводили на ЯМР спектрометре “Unity-300” фирмы “Varian” (США) с температурной приставкой VTC-4.

ИК-спектры снимали на Фурье-ИК спектрофотометре Vector 22 (Bruker) в диапазоне $4000 - 950 \text{ см}^{-1}$ со спектральным разрешением 4.0 см^{-1} и количеством сканов 128. Спектры пленок и сухих осадков нормировали на интенсивность в максимуме полосы 2920 см^{-1} , спектры растворов нормировали на интенсивность в максимуме полосы 1522 см^{-1} хлороформа.

Микрокалориметрические исследования проводили на 2-х канальном калориметре LKB-2277 (монитор биоактивности ВАРМ).

Удельную скорость роста бактерий и экономический коэффициент рассчитывали по формулам (Перт, 1978).

Математическая обработка экспериментальных данных. В работе применяли методы математической статистики (Лакин, 1990), а также программное обеспечение Origin 4.0. Различие между вариантами считали достоверным при критерии вероятности $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сульфатредуцирующие бактерии р. *Desulfovibrio* были протестированы на способность к трансформации нитроцеллюлозы (НЦ). Все исследованные бактерии способны вести трансформацию НЦ с содержанием азота 11,8%. В процессе роста *D. desulfuricans* 1388, *D. desulfuricans* 1799, *D. gigas* 1382, *D. vulgaris* 1760 в органотрофных условиях количество НЦ снижается на 4,9 - 9,3% (табл. 1). Это существенно превышает уровень спонтанного химического гидролиза НЦ сероводородом (2%), который является естественным продуктом метаболизма сульфатредуцирующих бактерий. Удельная скорость трансформации ксенобиотика за 15 суток культивирования составляет 4,6 - 7,3 мг НЦ /мг белка. Одновременно наблюдается снижение количества азота в остаточной НЦ на 2 - 6%

Таблица 1.

Трансформация НЦ различными видами бактерий рода *Desulfovibrio*

Виды р. <i>Desulfovibrio</i>	Остаточная НЦ г/л	Убыль НЦ, %	Уд. скорость транс- формации, мг/мг
<i>D. desulfuricans</i> 1388	$7.78 \pm 0,12$	9.3	7.4 ± 0.09
<i>D. desulfuricans</i> 1799	7.97 ± 0.16	7.0	6.3 ± 0.10
<i>D. vulgaris</i> 1760	7.78 ± 0.16	9.3	5.4 ± 0.08
<i>D. gigas</i> 1382	8.16 ± 0.04	4.9	4.7 ± 0.09

*Исходное количество НЦ составляло $8,58 \pm 0,04$ г/л.

Заметное снижение количества полимера происходит в стационарную фазу роста бактерий, на 8-е сутки культивирования. Динамика накопления и потребления свободных нитрат-ионов, а также ионов аммония (рис.1) свидетельствует о протекании процесса трансформации НЦ и использовании продуктов трансформации бактерией *D. desulfuricans* 1388.

Трансформация полимера определяется не только индивидуальными

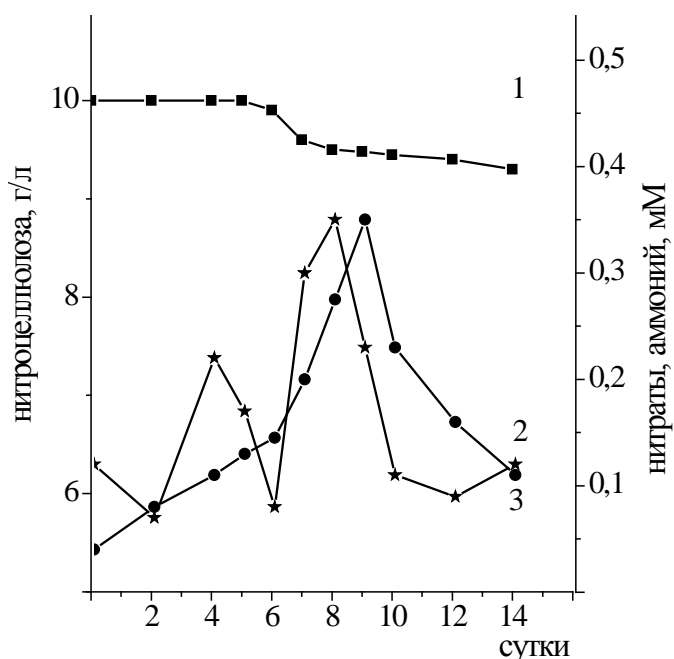


Рис.1. Убыль нитроцеллюлозы (1), выделение нитратов (2) и аммония (3) при культивировании *D. desulfuricans* 1388

особенностями организма-утилизатора, но зависит также от условий культивирования бактерий. Изучение возможности использования полимера в метаболизме *D. desulfuricans* 1388 показало, что НЦ не является единственным источником углерода и азота, а также донором электронов для микроорганизма, хотя, по-види-

мому, может служить акцептором электронов, что согласуется с данными литературы (Freedman et al.,

2002). Показано, что наиболее эффективно процесс биологической трансформации НЦ происходит на полной питательной среде – 14% за 60 суток. Эффективность трансформации НЦ увеличивается, если использовать метод дробного добавления субстрата. В условиях, когда бактерия получает дополнительное питание, убыль НЦ составляет более 25 %.

Влияние НЦ на метаболизм D. desulfuricans 1388 в органотрофных условиях роста

Изучение динамики потребления лактата и продукции сероводорода сульфатредуцирующей бактерией *D. desulfuricans* 1388 в присутствии НЦ

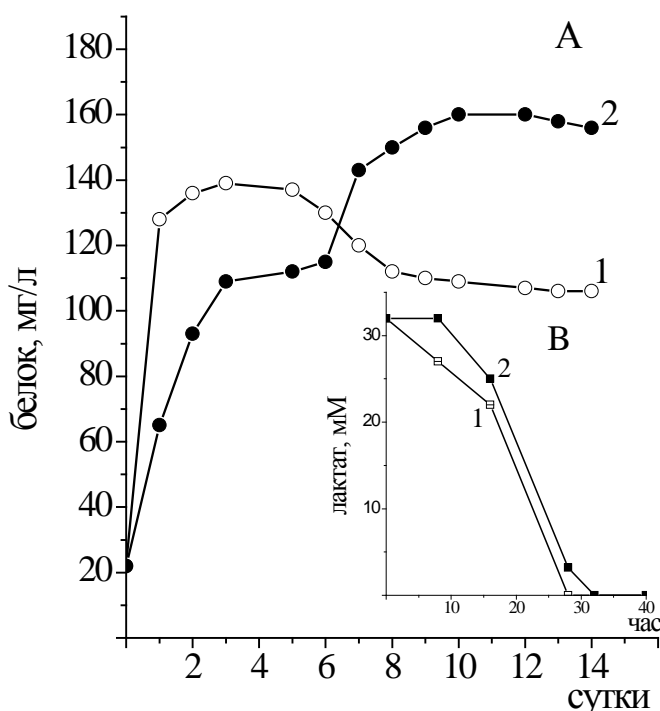
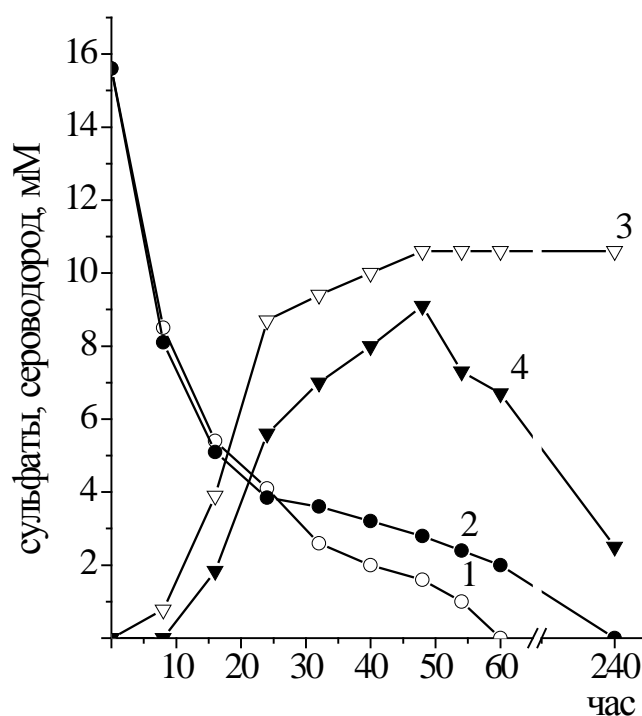


Рис.2. Рост *Desulfovibrio desulfuricans* (A) и потребление лактата (B) на среде Постгейта Б(1) и на среде Постгейта Б с НЦ (2)

показало, что уже с первых часов культивирования полимер оказывает угнетающее действие на эти процессы (рис. 2,3). Наблюдается замедление роста бактерии, которое выражается в некотором увеличении длительности лаг-фазы, снижении удельной скорости роста и урожая бактериальной массы (табл. 2). Снижение молярного экономического коэффициента свидетельствует об увеличении затрат субстрата на синтез единицы биомассы.

О влиянии НЦ на метаболические процессы *D. desulfuricans* 1388 свидетельствует и изменение характера тепловыделения при росте бактерии в присутствии полимера. Выделение тепла бактериями в процессе роста отражает не абсолютное число клеток, а скорее производную этой величины по времени, иначе говоря, активность размножения бактериальных клеток (Кальве, Прат, 1963). Поэтому повышенное удельное тепловыделение в присутствии полимера ($9,4 \pm 0,05$ Дж на 1 мг белка) по сравнению с контролем ($8,4 \pm 0,02$ Дж на 1 мг белка) может свидетельствовать о вызываемой НЦ разбалансированности катаболических и анаболических процессов в растущей культуре *D. desulfuricans* 1388. При этом в стационарной фазе в присутствии полимера регистрируется постоянное остаточное тепловыделение (15 мкВт), несмотря на то, что энергетический субстрат (лактат) в среде полностью исчерпывается, что говорит о сохранении некоторой метаболической активности в клетках *D. desulfuricans* 1388.

Угнетение метаболических процессов у *D. desulfuricans* 1388 в



присутствии нетоксичного по своей природе соединения связано, прежде всего, с попаданием в ростовую среду свободных

Рис.3. Поглощение сульфата (1, 2) и выделение сероводорода (3, 4) *D. desulfuricans* 1388 при росте на среде Постгейта Б (1, 3) и на среде Постгейта Б с НЦ (2, 4)

нитрат-ионов (0,12 мМ), адсорбированных молекулами полимера в процессе нитрования. Введение нитратов среду для культивирования бактерий приводит к снижению как прироста биомассы (110 мг белка/л по сравнению с 140 мг белка/л в контроле), так и количества выделенного культурой *D. desulfuricans* 1388 сульфида (8,3 мМ по сравнению с 11,5 мМ в контроле). Параметры роста в присутствии нитратов близки к таковым при выращивании бактерии с нитроцеллюлозой. Для некоторых сульфатредуцирующих бактерий известно, что нитраты могут ингибировать сульфатредукцию полностью или частично (Mitchell, 1986, Krekeler et al., 1995). Для *D. desulfuricans* 1388 показано, что бактерия использует нитраты на лактатсодержащей среде в присутствии следовых количеств сульфатов, но прирост биомассы в этом случае существенно ниже, чем на полной среде Постгейта Б (Золотухина, 1985). Одновременное присутствие нитратов и сульфатов в ростовой среде *D. desulfuricans* DT 101 вызывало распределение потока электронов между двумя акцепторами (Keith, Herbert, 1983). Поэтому нитраты, привнесенные в среду культивирования бактерий вместе с НЦ, рассматриваются нами как фактор, способный влиять на метаболизм сульфатредуцирующей бактерии *D. desulfuricans* 1388, оттягивая на себя часть восстановительных эквивалентов, идущих на восстановление

сульфатов.

Таблица 2.

Параметры роста *D. desulfuricans* 1388 на среде Постгейта Б без/в присутствии НЦ или нитратов

Условия культиви-рования	Время генерации, ч	Уд. скорость роста, ч ⁻¹	Экономический коэффициент г/моль	Метаболический коэффициент, ммоль/(г · ч)
контроль	9.4 ± 0.12	0.074 ± 0.001	6.68 ± 0.20	11.0
НЦ	12.2 ± 0.09	0.057 ± 0.002	5.70 ± 0.15	10.0
нитраты	12,0 ± 0,11	0,060 ± 0,005	6,10 ± 0,10	9.8

Гидролиз нитроэфирных связей НЦ

Разрушение полимера может идти по двум направлениям: во-первых, с разрывом углеродной цепи по β-1,4-гликозидной связи с образованием нитроолигосахаридов различной длины (Ильинская, 1987). Во-вторых, с элиминацией нитрогрупп, или денитрацией, что приводит к снижению степени нитрованности полимера (Duran et al, 1995). Исследование трансформации полимера в присутствии *D. desulfuricans* 1388 показало, что процесс в основном заключается в отщеплении нитрогрупп от молекулы полимера. Об этом свидетельствует убыль НЦ из среды культивирования бактерии и появление свободных нитрат-ионов.

Гидролиз нерастворимых соединений определяется способностью микроорганизма синтезировать внеклеточные гидролитические ферменты. Клеточные экстракты *D. desulfuricans* 1388 и культуральная жидкость после бактериального роста катализируют гидролиз нитроэфирных связей НЦ с образованием нитрат-ионов. Способность к гидролизу нитроэфирных связей является конститутивным свойством бактерии. При этом внеклеточная нитроэстеразная активность *D. desulfuricans* 1388 составляет около 33 % от общей нитроэстеразной активности. Динамика проявления нитроэстеразной активности совпадает по характеру с динамикой роста культуры (рис. 4).

Присутствие НЦ в ростовой среде не влияет на внутриклеточную нит-

роэстеразную активность, величина которой составляет около 5 ед/мин, но

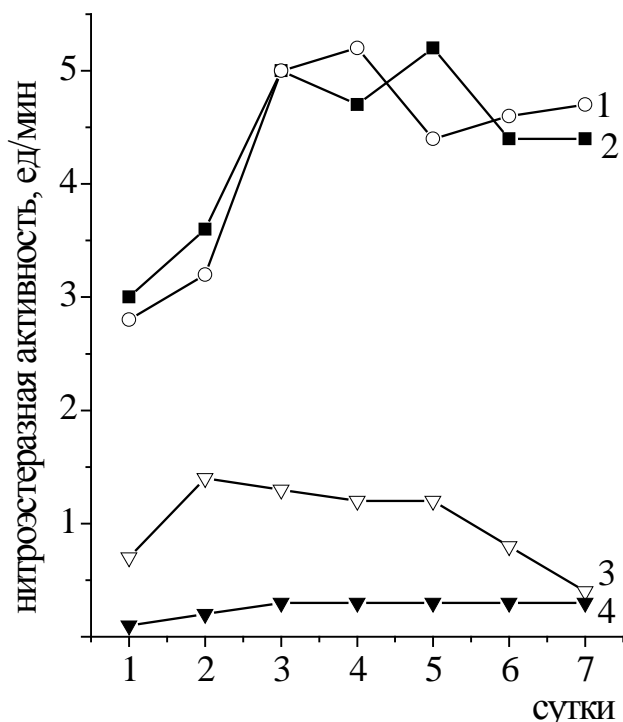


Рис.4. Изменение нитроэстеразной активности в клеточном экстракте (1, 2) и культуральной жидкости (3, 4) в процессе роста *D. desulfuricans* 1388 в среде Постгейта Б (1, 3) и в среде Постгейта Б с нитроцеллюлозой (2, 4)

ведущих гидролиз фосфоэфирных связей (Диксон, Уэбб, 1982).

В результате проведенных исследований установлено, что и нитроэстеразная активность и активность щелочной фосфатазы *D. desulfuricans* 1388, появляются в экспоненциальную фазу роста бактерии, достигая максимального значения (5,0 ед/мин и 9,2 ед/мин соответственно) в стационарную фазу роста (рис.5). Активность кислой фосфатазы регистрируется только в стационарной фазе роста и составляет 2,6 ед/мин. При культивировании бактерии на среде Постгейта Б в присутствии 0,12 мМ нитратов активность внеклеточной щелочной фосфатазы подавляется (3,3 ед/мин контроле и 1,5 ед/мин в опыте), а внутриклеточная активность остается без изменений (около 9 ед/мин). Эти данные прямо коррелируют с

вызывает снижение ферментативной активности в культуральной жидкости с 1,2 ед/мин до 0,3 ед/мин. Культивирование *D. desulfuricans* 1388 на среде Постгейта Б с 0,12 мМ нитратов оказывает аналогичное действие на вне- и внутриклеточную нитроэстеразную активность бактерии.

Гидролиз нитроэфирной связи НЦ может осуществляться неспецифическими фосфатазами (Ильинская, 1987). Участие фосфатаз в гидролизе нитроэфира представляется наиболее вероятным благодаря широкому распространению фосфоэфиров в микробных клетках, схожести строения атомов азота и фосфора, а также в силу весьма широкой специфичности ферментов,

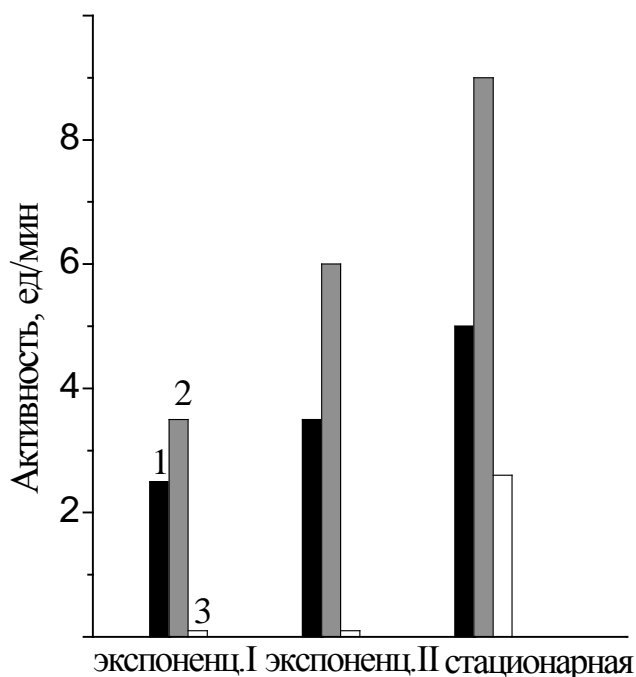


Рис.5. Активности эстераз по фазам роста *D. desulfuricans* 1388 при росте на среде Постагейта Б: 1 – нитроэстеразная активность, 2 – щелочная фосфатаза, 3 – кислая фосфатаза

с результатами, полученными для нитроэстеразной активности в аналогичных условиях роста.

Кроме того, установлено, что у бактериальных клеток, инкубированных в 0,5 М фосфатном буфере pH 7,6 в течение 3 часов, нитроэстеразная активность снижается на треть по сравнению с контрольными, выдержанными в 0,5 М трис-HCl буфере pH 7,5. В такой же степени подавляется экзогенным фосфатом и активность щелочной фосфатазы *D. desulfuricans* 1388.

Во всех экспериментах отмечено отсутствие корреляции активности кислой фосфатазы с нитроэстеразной активностью *D. desulfuricans* 1388.

Таким образом, начальный этап трансформации НЦ, осуществляемый бактерией *D. desulfuricans* 1388, включает в себя реакцию гидролиза нитроэфирной связи, катализируемую, вероятно, щелочной фосфатазой широкого спектра действия.

Восстановление нитратов клетками *D. desulfuricans* 1388

Изучение динамики накопления – потребления нитратов, освободившихся в результате трансформации ксенобиотика, показало, что нитрат-ионы восстанавливаются культурой *D. desulfuricans* 1388 до аммония, который регистрируется в ростовой среде. Это свидетельствует о функционировании диссимиляторного пути восстановления нитратов у исследуемого микроорганизма. Клеточные экстракты *D. desulfuricans* 1388 облада-

ют нитратредуктазной активностью (220 нмоль/мин на мг белка), локализованной в основном (до 85 %) во фракции “цитоплазма + мембраны”, и нитритредуктазной активностью (1,5 мкмоль/мин на мг белка), равномерно распределенной по клеточным фракциям.

Нитритредуктаза сульфатредуцирующих бактерий представляет собой конститутивный фермент (Moura et al., 1997), в то время как нитратредуктаза у этих бактерий является чаще всего индуцибельным ферментом, синтез которого регулируется присутствием экзогенного нитрата либо недостатком сульфата в ростовой среде (Seitz, Cypionka, 1986, Dalsgaard, Bak, 1994). Лишь отдельные виды сульфатредукторов имеют конститутивную нитратредуктазу (Mitchell et al., 1986). Нитрат- и нитритредуктазная активности клеточных экстрактов *D. desulfuricans* 1388 в присутствии НЦ соответствуют контрольным значениям (табл.3). Обнаружение нитратредуктазной активности у клеток *D. desulfuricans* 1388, выращенных на среде с сульфатами в отсутствие нитратов или НЦ позволяет предположить, что восстановление нитратов сульфатредуцирующей бактерией *D. desulfuricans* 1388 может осуществляться либо конститутивной нитратредуктазой, либо редуктазами широкого спектра действия.

Таблица 3.

Нитрат- и нитритредуктазная активности клеточных экстрактов *D. desulfuricans* 1388

Условия культивирования	Нитратредуктазная активность, мкмоль/(мин · мг)	Нитритредуктазная активность, мкмоль/(мин · мг)
контроль	0,22 ± 0,01	1,5 ± 0,07
НЦ	0,24 ± 0,01	1,4 ± 0,06

Гидролиз β-гликозидных связей НЦ

Прирост бактериальной массы *D. desulfuricans* 1388, наблюдаемый нами на 8-е сутки культивирования (рис.2) в присутствии НЦ, предполагает использование бактериями труднодоступного углерода НЦ для поддер-

жания своей жизнедеятельности в условиях “голодания”. В литературе отсутствуют сведения о способности сульфатредуцирующих бактерий к гидролизу β -1,4-гликозидных связей полисахаридов. Однако, имеются данные о возможном гидролитическом расщеплении гликозидных связей НЦ органическими кислотами, которые выделяются микроорганизмами в процессе роста (Brodman, Devine, 1981). Спонтанный гидролиз β -1,4-гликозидных связей целлюлозы и НЦ с образованием растворимых редуцирующих сахаров, может быть вызван ацетатом, который выделяется в ростовую среду как продукт неполного окисления лактата бактерией *D. desulfuricans* 1388. Через 20 суток экспозиции НЦ в 32 М растворе ацетата количество редуцирующих сахаров в реакционной среде составляет $44,2 \pm 1,0$ мг/л для целлюлозы и $27,5 \pm 0,9$ мг/л для НЦ. Способность сульфатредуцирующей бактерии *D. desulfuricans* 1388 использовать целлобиозу (мономерное звено целлюлозы) в своем метаболизме как донор электронов показана впервые. В этом качестве целлобиоза может обеспечивать минимальные ростовые потребности бактерии: прирост биомассы при этом достигает 32 мг/л, а сульфида – 32,5 мг/л.

Таким образом, жизнедеятельность сульфатредуцирующей бактерии *D. desulfuricans* 1388 при дефиците питательных веществ, но в присутствии НЦ, может быть связана с переключением электрон-транспортной системы бактерии на альтернативный акцептор электронов (нитраты) при наличии в среде донора электронов, в качестве которого по исчерпанию лактата могут выступить редуцирующие сахара (целлобиоза).

Анализ изменений в молекуле НЦ, происходящих под действием D. desulfuricans 1388

Данные ^{13}C ЯМР-спектроскопии указывают, что в образце НЦ (ацетоновый экстракт), подвергшейся воздействию *D. desulfuricans* 1388 в течение 60 суток, присутствуют незамещенные глюкопиранозные фрагменты. Опытный образец характеризуется более низкой степенью нитрованности по сравнению с исходной НЦ: средняя степень замещения атомов водорода на ONO_2^- группу составляет 2,4 и 2,59 соответственно.

По данным FTIR-спектроскопии в образце НЦ после контакта с *D.*

desulfuricans 1388 происходит увеличение количества гидроксильных

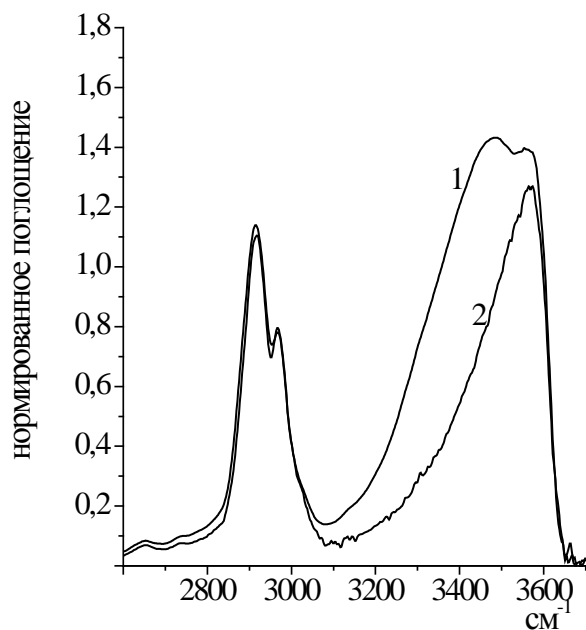


Рис.6. Спектры пленок НЦ, осажденных из растворов в ацетоне. Нормированы на интенсивность полосы 2920 см⁻¹.

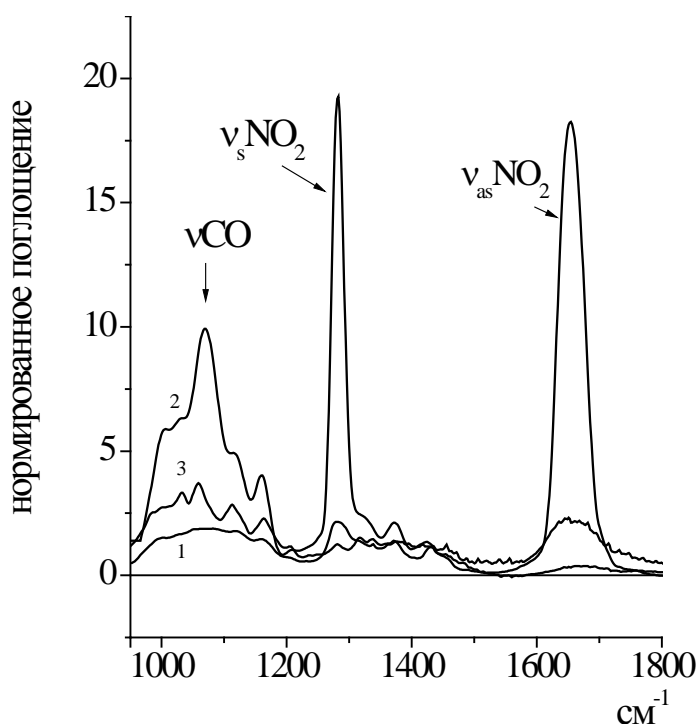


Рис.7. Спектры твердых садков, нерастворимых в ацетоне. Образцы в КВг.

1 - целлюлоза нативная, 2 – нитроцеллюлоза, 3 - спектр осадка после экстракции ацетоном (после инкубации НЦ с бактериями на среде Постгейта Б в течение 60 дней)

групп при одновременном снижении нитрогрупп (рис.6). Отмечается также

появление короткоцепочечных нитроолигосахаридов. Установлено, что спектр сухого осадка опытного образца после экстракции из него НЦ приближается к спектру нативной целлюлозы (рис. 7).

Таким образом, длительный контакт НЦ с клетками *D. desulfuricans* 1388 приводит к тому, что в макромолекуле поли-

мера происходят значительные изменения, в результате которых в ростовой среде накапливается продукт гидролиза нитроэфирных связей – целлюлоза.

Разложение отходов производства НЦ

Взрыво- и пожароопасность НЦ требует особых условий ее хранения. Для этих целей на предприятиях по производству НЦ используются крупнотоннажные пруды-отстойники. Эти пруды, с их бескислородной средой, содержащей широкий спектр органических и неорганических веществ, являются уже готовой нишей для испытания анаэробных микроорганизмов в качестве активных деструкторов НЦ.

Изучено разложение отходов производства НЦ, полученных из заводского отстойника, с помощью сульфатредуцирующей бактерии *D. desulfuricans* 1388. В течение 3-х недельного эксперимента убыль НЦ составила 28,1% (рис. 8), что существенно выше, чем в лабораторных опытах с периодическим культивированием бактерии. Это, вероятно, связано с тем, что отходы НЦ из отстойника состоят из неравномерно замещенных ди- и мононитратов, содержание азота в которых составляет 6,7 – 7,8 %, что облегчает процесс биологической трансформации ксенобиотика.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования сульфатредуцирующих бактерий в качестве добавки к активному илу очистных сооружений предприятий по производству нитроцеллюлозы.

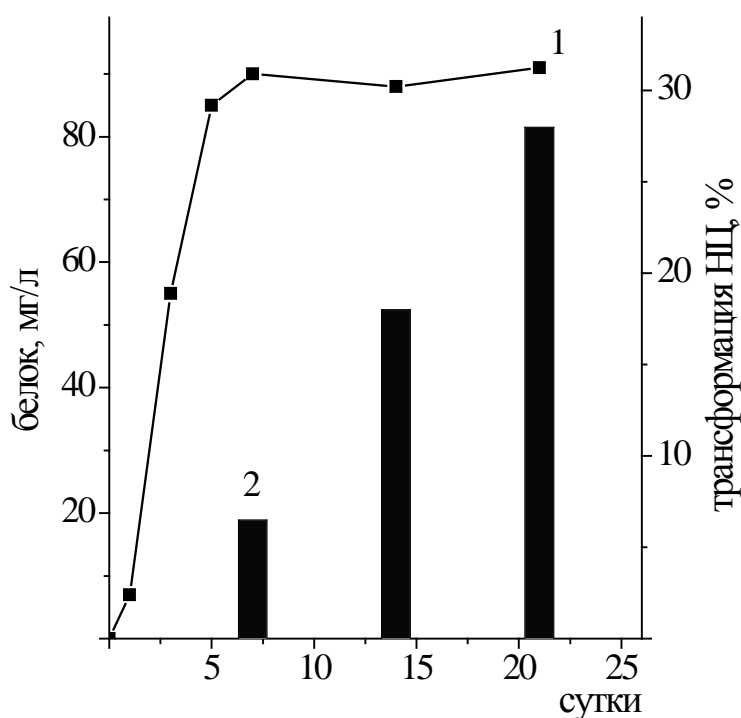


Рис.8. Динамика трансформации нитроцеллюлозы из отстойника в процессе роста *D.desulfuricans* 1388
1 - кривая роста
2 - % трансформации нитроцеллюлозы

Заключение

Рост *D. desulfuricans* 1388 на НЦ сопровождается образованием сгустка, содержащего частицы полимера, бактериальные клетки, нерастворимые соли. Установлено, что весь сероводород, образуемый бактерией, регистрируется в осадке, концентрация нитрат-ионов в области осадка в 3 раза выше, чем в культуральной жидкости, а 2 % клеток остаются связанными с полимером даже после энергичного встряхивания. Исходя из этого, мы предполагаем, что в процессе роста *D. desulfuricans* 1388 на НЦ формируется бактериальный матрикс. Его формирование связано, по-видимому, с окончанием периода активного роста и переходом культуры в стационарную фазу роста, когда бактериальная популяция достигает определенной плотности (Олескин с соавт., 1993). Бактериальные клетки оседают на пористой поверхности НЦ, проникая между частицами полимера, внеклеточные полимерные вещества, синтезируемые клетками, окружают осадок НЦ и отделяют его от культуральной среды. Секреция таких веществ, по-видимому, полисахаридной природы, показана для сульфатредуцирующих бактерий (Okabe, 1995; Liu, Fang, 2002). Все последующие процессы, скорее всего, идут в ограниченном объеме, при непосредственном контакте между бактериями и продуктами их метаболизма с одной стороны, и НЦ с другой. Такое местное и концентрированное воздействие активных агентов увеличивает эффективность процесса трансформации НЦ. В результате действия ферментов и метаболитов образуются нитраты и целлобиоза, которые могут поддерживать жизнедеятельность бактерии.

Таким образом, полученные нами результаты позволяют констатировать, что синтетический полимер нитроцеллюлоза, оказывая угнетающее действие на растущую культуру сульфатредуцирующей бактерии *D. desulfuricans* 1388, подвергается бактериальной трансформации в стационарную фазу роста микроорганизма. Продукты трансформации могут использоваться бактерией для поддержания жизнедеятельности в условиях дефицита питательных веществ.

ВЫВОДЫ

1. Впервые для сульфатредуцирующих бактерий р. *Desulfovibrio*: *D. desulfuricans* 1388, *D. desulfuricans* 1799, *D. gigas* 1382, *D. vulgaris* 1760, показана возможность трансформации нитроцеллюлозы высокой степени нитрованности. Трансформация нитроцеллюлозы *D. desulfuricans* 1388 осуществляется предпочтительно в условиях полноценной питательной среды.
2. Трансформация нитроцеллюлозы бактерией *D. desulfuricans* 1388 включает в себя процесс денитрации с образованием нативной целлюлозы.
3. Гидролиз эфирных связей в молекуле нитроцеллюлозы неспецифическими эстеразами приводит к образованию нитрат-ионов. Образовавшиеся нитраты восстанавливаются до ионов аммония по диссимиляторному пути.
4. Показано, что изменение физиолого-биохимических и термодинамических параметров роста *D. desulfuricans* 1388 в присутствии нитроцеллюлозы обусловлено влиянием свободных нитратов.
5. Сульфатредуцирующие бактерии р. *Desulfovibrio* можно рассматривать в качестве первичного звена в микробном консорциуме при утилизации отходов, содержащих нитроцеллюлозу.

Автор выражает глубокую признательность Н. Б. Тарасовой, Д. А. Файзуллину, А. Ю. Алябьеву, В. С. Куцаку, В. В. Ключкову за помощь в работе и ценные рекомендации.

Работы, опубликованные по теме диссертации

1. Куцак В. С. Биохимическая деструкция азотнокислых эфиров целлюлозы / В. С. Куцак, М. Н. Давыдова, О. Е. Петрова // Материалы IV научной конференции “Актуальные экологические проблемы республики Татарстан”. Казань. – 2000. – С. 138.
2. Petrova O. E. Transformation of nitroethers of cellulose by *Desulfovibrio desulfuricans* / О. Е. Petrova , М. N. Davydova // The FEBS Journal 27-th Meeting of the FEBS. 30 June – 5 July 2001. Lisbon, Portugal.- 2001. – P. 137.

3. Петрова О. Е. Микробная деструкция нитратов целлюлозы / О. Е. Петрова, Н. Б. Тарасова, Ф. К. Мухитова и др. // Тезисы семинара “Биотехнологии – 2001”. 25 – 27 сентября 2001. Пущино. – 2001. - С. 125 – 126.
4. Petrova O. E. Biotechnological potential of sulfate-reducing bacteria for nitroethers of cellulose transformation / O. E. Petrova, N. B. Tarasova // The 6-th biennial Congress of the Anaerobe Society of the America. 29 June – 2 July 2002. Park City, Utah USA. – 2002. - P. 106.
5. Давыдова М. Н. Биodeградация нитратов целлюлозы: использование сульфатредуцирующих бактерий / М. Н. Давыдова, О. Е. Петрова, Н. Б. Тарасова // III съезд биохимического общества. 26 февраля – 1 марта 2002. Санкт-Петербург. – 2002. - С. 32.
6. Petrova O. E. Sulfate-reducing bacteria in biological utilization process of industry wastes that contain cellulose nitrate / O. E. Petrova, M. N. Davydova, N. B. Tarasova et al. // “Biocatalysis 2002”. Fundamentals Application. 22 – 27 June 2002. Moscow, Russia. – 2002. - P. 121.
7. Петрова О. Е. Трансформация нитроэфира целлюлозы сульфатредуцирующей бактерией *D. desulfuricans* / О. Е. Петрова, Н. Б. Тарасова, М. Н. Давыдова // Микробиология. 2002. - Т. 71. - № 3. - С. 429 – 430.
8. Petrova O. E. Cellulose nitrate biodegradation process: sulfate-reducing bacteria used / O. E. Petrova, N. B. Tarasova, M. N. Davydova // Abstract book. ISSUME. 8 – 13 September 2002. Copenhagen, Denmark. – 2002. - P. 9.
9. Petrova O. E. Biotechnological potential of sulfate-reducing bacteria for transformation of nitrocellulose / O. E. Petrova, N. B. Tarasova, M. N. Davydova // Anaerobe. - 2002. – V. 8. – P. 315 – 317.
10. Петрова О. Е. Сульфатредуцирующие бактерии в биологической переработке промышленных отходов, содержащих нитроцеллюлозу / О. Е. Петрова, М. Н. Давыдова, Н. Б. Тарасова // Вестник МГУ, серия химия - 2003. - Т. 44. - № 1. - С. 44 – 45.
11. Петрова О. Е. Бактерии р. *Desulfovibrio* как первичное звено микробного консорциума при минерализации нитроцеллюлозы / О. Е. Петрова, Н. Б. Тарасова, М. Н. Давыдова // Международный конгресс “Наука и бизнес”. Пущино. - 2004. - С. 67.
12. Тарасова Н. Б. Изменения в молекуле нитроцеллюлозы под влиянием сульфатредуцирующей бактерии *Desulfovibrio desulfuricans* 1388. Ферменты, участвующие в этом процессе / Н. Б. Тарасова, О. Е. Петрова, М. Н. Давыдова и др. // Биохимия. - 2004. - Т. 68. - № 7. - С. 993 – 997.
13. Петрова О. Е. Перспективы использования сульфатредуцирующих бактерий в биотехнологии разложения отходов производства нитроцеллюло-

зы / О. Е. Петрова, Н. Б. Тарасова, М. Н. Давыдова // Материалы научной конференции “Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии”. 17 – 18 июня 2004. К. 2004. – С. 67 – 68.

14.Тарасова Н. Б. Сульфатредуцирующая бактерия *Desulfovibrio desulfuricans* вызывает изменения в молекуле нитроцеллюлозы / Н. Б. Тарасова, О. Е. Петрова, М. Н. Давыдова // Тезисы докладов на III съезде биофизиков России. 24 – 29 июня 2004. Воронеж. 2004. – Т. 2. – С. 725.

15.Петрова О. Е. ЯМР- и ИК-спектральный анализ молекулы нитроцеллюлозы после ее контакта с *Desulfovibrio desulfuricans* / О. Е. Петрова, Д. А. Файзуллин, Н. Б. Тарасова // Материалы XI Всероссийской конференции “Структура и динамика молекулярных систем”. Яльчик. 28 июня – 2 июля 2004. Казань. 2004. С. 204.